



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑯ Offenlegungsschrift
⑯ DE 199 50 225 A 1

⑯ Int. Cl. 7:
G 02 B 26/10
G 02 B 21/00

⑯ Aktenzeichen: 199 50 225.0
⑯ Anmeldetag: 19. 10. 1999
⑯ Offenlegungstag: 18. 5. 2000

⑯ Innere Priorität:
198 49 143. 3 24. 10. 1998

⑯ Erfinder:
Engelhardt, Johann, Dr., 76669 Bad Schönborn, DE

⑯ Anmelder:
Leica Microsystems Heidelberg GmbH, 69120
Heidelberg, DE

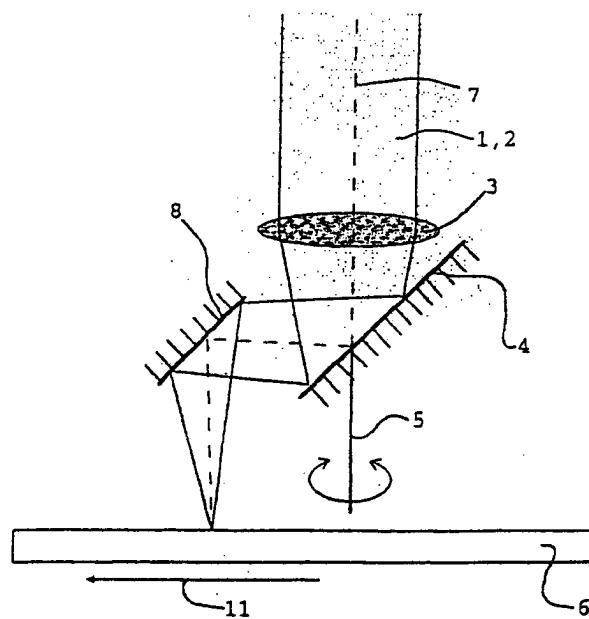
⑯ Vertreter:
Ullrich & Naumann, 69115 Heidelberg

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Anordnung zur optischen Abtastung eines Objekts

⑯ Eine Anordnung zur optischen Abtastung eines Objekts, insbesondere in der vorzugsweise konfokalen Laserscan-Mikroskopie, wobei im Beleuchtungs-/Detektionsstrahlengang (1, 2) eine Linse oder ein Objektiv (3) und mindestens ein Scanspiegel (4) angeordnet sind, ist zur Abtastung von die Objektfeldgröße der Mikroskopoptik überschreitende Objektfelder mit einer hinreichend schnellen Datenaufnahme und unter Verwendung einfacher optischer Komponenten dadurch gekennzeichnet, dass der Spiegel (4) mit einer zur Abtastfläche des Objekts zumindest weitgehend orthogonalen Drehachse (5) dreht bzw. schwenkt.



DE 199 50 225 A 1

DE 199 50 225 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine Anordnung zur optischen Abtastung eines Objekts, insbesondere in der vorzugsweise konfokalen Laserscan-Mikroskopie, wobei im Beleuchtungs-/Detektionsstrahlengang eine Linse oder ein Objektiv und mindestens ein Scanspiegel angeordnet sind.

Anordnungen der gattungsbildenden Art werden insbesondere zur Detektion von "Micro-Array-Biochips" (MAB) eingesetzt. MAB finden in der medizinischen Diagnostik Verwendung, wo eine große Anzahl von MAB in kurzer Zeit zu untersuchen und auszuwerten sind. Als MAB können Objekträger verwendet werden, bei denen eine große Anzahl von spezifischen Nachweisregionen (Spots) vorzugsweise gitterförmig aufgebracht sind. Diese Nachweisregionen haben meist einen Durchmesser von etwa 50 bis 100 μm und sind hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften zu untersuchen. Die Spots sind auf einem Objekträger auf einem Objektfeld von bis zu $22 \times 60 \text{ mm}$ verteilt.

Mit einem herkömmlichen konfokalen Laserscanmikroskop (CLSM) können jedoch Objekte, die auf so großen Objektfeldern verteilt sind nicht auf einmal abgebildet werden, da die Objektfelder der für solche Anwendungen in Frage kommenden Mikroskopobjektive hierfür zu klein sind. Eine Verwendung größerer Objektive bzw. Linsen bei bewegtem Strahl relativ zu den Linsen führt zu Bildunebenheiten und Intensitätsschwankungen. Hierbei werden die Bildunebenheiten durch Rest- bzw. Abbildungsfehler der verwendeten Linsen und Intensitätsschwankungen durch partielle Verschmutzung der optischen Komponenten im Strahlengang hervorgerufen.

Weiterhin ist der Beleuchtungsstrahlengang der CLSM's derart konfiguriert, dass der beugungsbegrenzte Scanstrahl in der Objektebene im Allgemeinen einen Durchmesser im Bereich von $1-2 \mu\text{m}$ aufweist. Die Objekte werden hierdurch mit einer für diese Anwendungen unnötigen und viel zu hohen Ortsauflösung abgetastet. Auch ist im Laborbetrieb ein hoher Durchsatz von zu untersuchenden Objekträgern gefordert, was mit den bislang bekannten CLSM's nicht erreicht werden kann.

Aus der DE 26 40 282 A1 ist für sich gesehen eine Anordnung zur optischen Abtastung eines Objekts bekannt, bei der ein Scanspiegel um zwei Achsen drehbar gelagert ist, wobei eine der beiden Drehachsen mit der optischen Achse des einfallenden Lichtstrahls zusammenfällt.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, eine Anordnung zur optischen Abtastung von Objekten anzugeben, mit der ein Objektfeld abtastbar ist, das die Objektfeldgröße der Mikroskopoptik überschreitet. Darüber hinaus soll mit der Anordnung eine hinreichend schnelle Datenaufnahme unter Verwendung einfacher optischer Komponenten möglich sein.

Die voranstehende Aufgabe wird durch die Merkmale des Patentanspruches 1 gelöst. Danach ist eine Anordnung zur optischen Abtastung eines Objekts, insbesondere in der vorzugsweise konfokalen Laserscan-Mikroskopie, dadurch gekennzeichnet, dass der Spiegel mit einer zur Abtastfläche des Objekts zumindest weitgehend orthogonalen Drehachse dreht bzw. schwenkt.

Erfindungsgemäß ist zunächst erkannt worden, dass MAB bzw. Objekträger der herkömmlichen Größe mit einer relativ schwach vergrößernden Optik einfach und schnell mit Hilfe einer Scaneinrichtung abtastbar sind. Hierbei beinhaltet die Scanvorrichtung die drehbar angeordneten optischen Komponenten, mindestens jedoch einen im Beleuchtungs-/Detektionsstrahlengang angeordneten Scanspiegel. Der Spiegel ist derart im Beleuchtungs-/Detektionsstrahlengang angeordnet, dass ein Objekt durch Drehen

bzw. Schwenken um eine zur Abtastfläche des Objekts zumindest weitgehend orthogonale Drehachse abgetastet werden kann. Durch die erfindungsgemäße Ausrichtung der Drehachse des Spiegels wird gewährleistet, dass mit der Scanvorrichtung eine ebene Abtastfläche des Objekts abtastbar ist.

In einer konkreten Ausführungsform fällt die Drehachse des Spiegels zumindest weitgehend mit der optischen Achse der Linse oder des Objektivs zusammen. Hierdurch kann in vorteilhafter Weise ein kleiner Scanspiegel eingesetzt werden, da der auf den Scanspiegel auftreffende Lichtstrahl – unabhängig von der momentanen Drehstellung des Scanspiegels – immer auf den gleichen zentralen Einfallspunkt auftrifft. Ein kleiner Scanspiegel weist außerdem eine geringe Masse auf, was eine hohe Scanfrequenz ermöglicht. Durch die besondere Anordnung der Drehachse des Spiegels und der optischen Achse können insbesondere Verzeichnungs- bzw. Verzerrungsartefakte minimiert werden, was einen zusätzlichen Vorteil der erfindungsgemäßen Anordnung darstellt. In einer alternativen Anordnung ist die Drehachse des Spiegels zumindest weitestgehend parallel zu der optischen Achse der Linse oder des Objektivs.

In einer weiteren Ausführungsform ist im Beleuchtungsstrahlengang der Linse oder dem Objektiv der Spiegel nachgeordnet. Hierbei ist lediglich der Spiegel drehbar bzw. schwenkbar angeordnet; die Linse oder das Objektiv ist ortsfest angeordnet. Der Arbeitsabstand der Linse oder des Objektivs muss derart gewählt werden, dass eine Beleuchtung bzw. Abbildung des Objekts nach einer Reflexion an dem Spiegel möglich ist. Falls der Arbeitsabstand der Linse bzw. des Objektivs vorgegeben ist, muss der drehbar bzw. schwenkbare Spiegel entsprechend angeordnet sein.

In einer alternativen Ausführungsform sind im Beleuchtungsstrahlengang der Linse oder dem Objektiv mindestens zwei Spiegel nachgeordnet. Diese beiden Spiegel sind in einer Halterung aufgenommen und gemeinsam – durch Drehung der Halterung – drehbar bzw. schwenkbar.

Auch kann den beiden Spiegeln die Linse oder das Objektiv nachgeordnet sein. Weiterhin ist es möglich, die Linse oder das Objektiv zwischen den beiden Spiegeln anzuordnen. In beiden Fällen sind die Spiegel und die Linse oder das Objektiv in einer gemeinsamen Halterung aufgenommen und durch Drehung dieser Halterung gemeinsam drehbar bzw. schwenkbar.

Die Halterung dreht bzw. schwenkt um eine Drehachse, die zur Abtastfläche des Objekts zumindest weitgehend orthogonal ist. Hierdurch wird gewährleistet, dass mit der von der Halterung aufgenommenen Scanningeinheit eine ebene Abtastfläche des Objekts abtastbar ist. Zur konkreten Realisierung einer solchen Anordnung wird es im Allgemeinen erforderlich sein, dass die Drehachse der Halterung derart angeordnet ist, dass sie zumindest weitgehend parallel zur optischen Achse des Abbildungsstrahlengangs vor der Halterung ist. Gegebenenfalls ist die Position der Drehachse der Halterung an die von der Halterung aufgenommenen Spiegel bzw. Linse oder Objektiv anzupassen. Um eine möglichst hohe Dreh- bzw. Schwenkfrequenz der Halterung zu erzielen, ist die Halterung möglichst massearm aus Material geringerer Dichte angefertigt.

Die beiden im Strahlengang angeordneten Scanspiegel könnten parallel zueinander angeordnet sein. In diesem Fall weist der von den beiden Spiegeln reflektierte Lichtstrahl gegenüber dem auf die beiden Spiegel zulaufende Lichtstrahl einen lateralen bzw. seitlichen Versatz auf. In einer alternativen Ausführungsform sind die beiden Spiegel nicht parallel zueinander angeordnet, daher ist die optische Achse des von den beiden Spiegeln reflektierten Lichtstrahls nicht mehr parallel zu der optischen Achse des Lichtstrahls, der

auf den beiden Spiegel zuläuft. Dennoch hat der von den beiden Spiegeln reflektierte Lichtstrahl im allgemeinen einen lateralen bzw. seitlichen Versatz zu dem ursprünglich auf die beiden Spiegel zulaufenden Lichtstrahl. Durch die Anordnung der Spiegel ist die Scan-Geometrie festgelegt sowie die Position des Objektträgers weitgehend vorgegeben.

In einer weiteren Ausführungsform weist die optische Achse des Beleuchtungsstrahlengangs vor der Scanningeinheit einen Winkel zur Drehachse der Scanningeinheit auf, der von 0 Grad verschieden ist. Hierbei könnte die Scanningeinheit einen Spiegel, zwei Spiegel, zwei Spiegel und eine Linse oder ein Objektiv aufweisen. Durch die Strahlführung der Scanningeinheit kann der durch die Scanningeinheit abgelenkte Lichtstrahl einen Einfallswinkel zur Abtastfläche des Objekts aufweisen, der von 0 Grad verschieden ist.

Vor zugweise durch entsprechende Anordnung mindestens eines Spiegels kann der Einfallswinkel zwischen der optischen Achse des Strahlengangs und der Abtastfläche des Objekts derart eingestellt werden, dass er von 0 Grad verschieden ist. Hierdurch ist es in vorteilhafter Weise möglich, den Haupt-Rückreflex des Anregungslichts, der vom Übergang Objektträger-Luft herröhrt zu unterdrücken bzw. aus dem Anregungs- und Detektionsstrahlengang auszublenden. Dies ist insbesondere deshalb von großer Bedeutung, da nun ein (Bandpass)-Sperrfilter geringerer Stärke eingesetzt werden kann, der die Leistung des zu detektierenden Fluoreszenzlichts nur unwesentlich herabsetzt. Die Ausblendung des Haupt-Rückreflexes ist insbesondere dann vorteilhaft, wenn zur Beleuchtung Laser eingesetzt werden, denn das zum Laser zurücklaufende Anregungslicht stört im Allgemeinen dessen stimulierte Emission, was zu unerwünschten Intensitätsschwankungen des Laserlichts führen kann. Weiterhin können Reflexionen an Objektträgerkanten vermieden werden, die zu störenden Interferenzen im Objektbereich und damit ebenfalls zu Artefakten bei der Bildaufnahme führen würden.

Der Winkel zwischen der optischen Achse des Strahlengangs vor der Scanningeinheit und der Drehachse der Scanningeinheit oder der Einfallswinkel zwischen der optischen Achse des Strahlengangs und der Abtastfläche des Objekts ist größer als 0 Grad und kleiner als 20 Grad. In vorteilhafter Weise kann zur Minimierung des Haupt-Rückreflexes des Anregungslichts der Winkel derart gewählt werden, dass er dem Brewster-Winkel des Übergangs Objektträger-Luft entspricht, da dann die Intensität des reflektierten Lichtstrahls nahezu 0 ist. Hierzu muss allerdings der einfallende Lichtstrahl linear polarisiert sein, was durch die Verwendung von Laserlichtquellen im Allgemeinen gegeben ist.

Der/die Objektträger werden mit Hilfe einer Transportvorrichtung entlang einer Richtung bewegt. Hierdurch wird der Objektträger während der Abtastung der Scanningeinheit entlang dieser Richtung abgetastet. Die Transportvorrichtung weist eine axiale Positionierungsgenauigkeit des Objektträgers von kleiner gleich $10 \mu\text{m}$ auf. Hierdurch kann in vorteilhafter Weise auf eine Autofokussierung der Objekt bzw. des Objektträgers verzichtet werden, vorausgesetzt, dass die verwendete Optik einen entsprechend großen Tiefenschärfenbereich aufweist.

In einer konkreten Ausführungsform dienen mehrere Lichtstrahlen zur Beleuchtung der Objekte. Diese könnten durch eine der Lichtquelle nachgeordnete Anordnung, bestehend aus Spiegel und teildurchlässigen Glaspflatten, erzeugt werden, so dass zur weiteren Beschleunigung des Abtastvorgangs ein Objektträger gleichzeitig mit mehreren Lichtstrahlen beleuchtet wird. Diese Lichtstrahlen könnten sowohl einen lateralen Versatz zueinander als auch einen

unterschiedlichen Einfallswinkel zur Abtastfläche des Objekts aufweisen. In gleicher Weise dienen mehrere Lichtstrahlen zur Detektion. Weiterhin ist es denkbar, dass als Lichtquelle mehrere Laser gleichzeitig eingesetzt werden.

5 Der/die Laser könnten ihrerseits auch jeweils verschiedene Wellenlängen emittieren. Zur Detektion könnten mehrere Detektoren gleichzeitig verwendet werden, so dass im Idealfall jedem der verwendeten Beleuchtungsstrahlen bzw. Detektionsstrahlen genau ein Detektor zugeordnet ist.

In weiter vorteilhafter Weise wird zur Beleuchtung der zu scannenden Objekte nur ein Teil der Objektivapertur genutzt. Der so von dem Objektiv bzw. Linse fokussierte Beleuchtungsstrahl weist aufgrund fundamentaler optischer Zusammenhänge einen größeren Tiefenschärfenbereich auf, verglichen zu einem Beleuchtungsstrahl, der die gesamte Objektivapertur nutzt. Das wirkt sich vorteilhaft auf die axiale Positionierungsgenauigkeit der Transportvorrichtung aus, da diese mit dem Tiefenschärfenbereich der verwendeten Optik direkt zusammenhängt. Quer zur optischen Achse ist dann jedoch keine beugungsbegrenzte Fokussierung gegeben; sie ist für die hier in Rede stehende Anwendung im Allgemeinen auch nicht notwendig. Die teilweise Ausnutzung der Beleuchtungs-Objektivapertur realisiert hinsichtlich des Detektionsstrahlengangs eine Art "Dunkelfeldbeleuchtung", so dass der Einfallswinkel zwischen der optischen Achse des Beleuchtungsstrahlengangs und der Abtastfläche des Objekts von 0 Grad verschieden ist. Auch hierdurch werden unerwünschte Haupt-Rückreflexe und Interferenzerscheinungen minimiert.

30 Zur Dunkelfeldbeleuchtung wird das Anregungslicht über einen Spiegel in den Strahlengang eingekoppelt. Dieser Spiegel kann entsprechend der zur Beleuchtung vorgesehenen Apertur relativ klein ausgestaltet sein, im Allgemeinen betragen die Ausmaße dieses Spiegels nur ein Bruchteil der Apertur der Linse bzw. des Objektivs.

In einer konkreten Ausführungsform wird der Hauptreflex des Anregungslichts über einen Spiegel zu einem Fokuspositionsdetektor geleitet. Dieser Spiegel kann ebenfalls kleine Ausmaße aufweisen, wenn der aus dem Hauptreflex resultierende Durchmesser des Lichtstrahls einen entsprechend kleinen Querschnitt aufweist. Durch das Einbringen des Ein- bzw. des Auskoppelspiegels reduziert sich die Detektionsapertur nur um einen Bruchteil der insgesamt nutzbaren Apertur des Objektivs bzw. der Linse. Der Fokuspositionsdetektor könnte aus einer zwei- oder viergeteilten Photodiode bestehen, so dass mit Hilfe der Daten des Fokuspositionsdetektors eine Auto-Fokussierung des Objektträgers durchführbar ist. Wenn der Tiefenschärfenbereich bezüglich der Beleuchtung/Detektion kleiner als die Positionierungsgenauigkeit der Transportvorrichtung ist, ist zur Abtastung des Objekts eine Auto-Fokussierung des Objektträgers während der Datenaufnahme notwendig. Hierdurch wäre sicher gestellt, dass die abzutastenden, auf dem Objektträger befindlichen Objekte während der Datenaufnahme stets im Tiefenschärfenbereich des Anregungs- bzw. Detektionsstrahlengangs liegen, und auch tatsächlich detektiert werden. Eine Auto-Fokussierung könnte entweder durch eine axiale Positionierung des Objektivs bzw. der Linse oder durch eine axiale Positionierung des Objektträgers, beispielsweise über die Transportvorrichtung, realisiert werden.

65 In Abhängigkeit von dem Durchmesser der zu detektierenden Objekte werden die im Strahlengang verwendeten optischen Komponenten derart zusammengestellt, dass der Beleuchtungsdurchmesser des Laserstrahls bzw. der Laserstrahlen in der Objektebene einen Durchmesser aufweist, der größer als $1 \mu\text{m}$ und kleiner als $300 \mu\text{m}$ ist. Durch geeignete Wahl des Beleuchtungsdurchmessers in der Objekt-

ebene kann mit einer für die Identifizierung und Quantifizierung der Objekte optimalen Ortsauflösung abgetastet werden. Abhängig vom Abstand benachbarter Spots und deren Durchmesser kann ein Beleuchtungsdurchmesser in der Objektebene gewählt werden, der das Abtasttheorem zur Detektion dieser Struktur erfüllt. Eine Verringerung der Ortsauflösung hat eine Verringerung der aufgenommen Daten zur Folge, so dass der Aufnahmevergäng hierdurch darüber hinaus in vorteilhafter Weise zusätzlich zeitlich verkürzt werden kann.

Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, die Lehre der vorliegenden Erfindung in vorteilhafter Weise auszustalten und weiterzubilden. Dazu ist einerseits auf die dem Patentanspruch 1 nachgeordneten Patentansprüche, andererseits auf die nachfolgende Erläuterung von Ausführungsbeispielen der Erfindung anhand der Zeichnungen zu verweisen. In Verbindung mit der Erläuterung der bevorzugten Ausführungsbeispiele anhand der Zeichnungen werden auch im Allgemeinen bevorzugte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der Lehre erläutert. In den Zeichnungen zeigt

Fig. 1 in einer schematischen Darstellung ein erstes Ausführungsbeispiel einer erfundungsgemäßen Anordnung zur optischen Abtastung eines Objekts.

Fig. 2 in einer schematischen Darstellung eine Anordnung zur optischen Abtastung eines Objekts, die lediglich einen Scanspiegel aufweist.

Fig. 3 in einer schematischen Darstellung eine erfundungsgemäße Anordnung zur optischen Abtastung eines Objekts mit einer Halterung der beiden Spiegel,

Fig. 4 in einer schematischen Darstellung eine Ansicht einer erfundungsgemäßen Anordnung zur optischen Abtastung eines Objekts mit einer Halterung der beiden Spiegel,

Fig. 5 in einer schematischen Darstellung eine Anordnung zur optischen Abtastung eines Objekts, bei der im Beleuchtungsstrahlengang die Linse bzw. das Objektiv den beiden Spiegeln nachgeordnet ist,

Fig. 6 in einer schematischen Darstellung eine alternative Anordnung zur optischen Abtastung eines Objekts, bei der die Linse bzw. das Objektiv zwischen den beiden Spiegeln angeordnet ist,

Fig. 7 in einer schematischen Darstellung eine alternative Anordnung zur optischen Abtastung eines Objekts, bei der die beiden Spiegel nicht parallel zueinander angeordnet sind,

Fig. 8 ein von einer Anordnung zur optischen Abtastung eines Objekts erzeugtes Abtastmuster,

Fig. 9 in einer schematischen Darstellung eine Anordnung zur optischen Abtastung eines Objekts, bei der eine Dunkelfeldbeleuchtung realisiert ist,

Fig. 10 in einer schematischen Darstellung eine Anordnung zur optischen Abtastung eines Objekts, bei der eine Dunkelfeldbeleuchtung in Verbindung mit einer Fokuspositionsdetektionseinrichtung realisiert ist,

Fig. 11 in einer schematischen Darstellung den Querschnitt des Detektionsstrahlengangs aus Fig. 10.

Die Fig. 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9 und 10 zeigen jeweils eine Anordnung zur optischen Abtastung eines Objekts in der konfokalen Lasercan-Mikroskopie. Im Beleuchtungs/Detektionsstrahlengang 1, 2 ist eine Linse oder ein Objektiv 3 und mindestens ein Scanspiegel 4 angeordnet. Der Scanspiegel 4 dreht bzw. schwenkt mit einer zur Abtastfläche des Objekts zumindest weitgehend orthogonalen Drehachse 5. Das Objekt befindet sich auf dem Objekträger 6. Gemäß der in den Fig. 1, 3, 5, 6, 7, 9 und 10 gewählten Darstellung fällt die Drehachse 5 des Spiegels 4 mit der optischen Achse der Linse bzw. des Objektivs von der Spiegelanordnung zusammen.

In Fig. 2 ist der Linse 3 der Spiegel 4 nachgeordnet, die

Drehachse 5 des Spiegels 4 ist auch hier orthogonal zur Abtastfläche der auf dem Objekträger 6 befindlichen Objekte. Das Licht zur Beleuchtung der Objekte kommt von einer in Fig. 2 nicht gezeigten Lichtquelle und läuft kolliniert entlang der optischen Achse 7 zur Linse 3, die den Beleuchtungsstrahl fokussiert. Der konvergent verlaufende Beleuchtungsstrahl trifft auf den Scanspiegel 4, nach dessen Reflexion trifft das Beleuchtungslicht auf den Objekträger 6. Das durch das Beleuchtungslicht angeregte Fluoreszenzlicht durchläuft den Weg des Beleuchtungsstrahlengangs in umgekehrter Richtung und trifft auf einen in Fig. 2 nicht gezeigten Strahlteiler, der das Fluoreszenzlicht zu einem ebenfalls nicht gezeigten Detektor leitet.

In den Fig. 1, 3, 7, 9 und 10 sind erfundungsgemäße Ausführungsformen einer Anordnung zur optischen Abtastung eines Objekts dargestellt, bei der im Beleuchtungsstrahlengang der Linse oder dem Objektiv 3 mindestens zwei Spiegel 4, 8 nachgeordnet sind. In den Fig. 3 und 4 ist angedeutet, dass die beiden Spiegel 4, 8 hierbei in einer gemeinsamen Halterung 9 aufgenommen sind.

In Fig. 5 ist den beiden Spiegeln 4, 8 die Linse 3 nachgeordnet. In einer alternativen Ausführungsform gemäß Fig. 6 ist die Linse 3 zwischen den beiden Spiegeln 4, 8 angeordnet. Der Spiegel 4, 8 und die Linse 3 aus den Fig. 5 und 6 sind in einer gemeinsamen Halterung aufgenommen. Wie in den Fig. 3 und 4 angedeutet, schwenkt bzw. dreht die Halterung 9 mit einer zur Abtastfläche des Objekts orthogonalen Drehachse 5, und fällt mit der optischen Achse des Abbildungsstrahlengangs vor der Halterung zusammen. Die Halterung 9 ist aus Material geringer Dichte, nämlich Aluminium in Leichtbauweise, angefertigt.

Den Ausführungsformen gemäß den Fig. 1, 3, 5, 6, 9 und 10 kann entnommen werden, dass die beiden Spiegel 4, 8 parallel zueinander angeordnet sind. Der orthogonal zur Abtastfläche des Objekts verlaufende Beleuchtungsstrahlengang mit der optischen Achse 7 trifft in diesen Ausführungsformen nach Durchlaufen der aus den beiden Spiegeln 4, 8 bestehenden Scanningeinheit orthogonal auf die Abtastfläche der Objekte auf.

In der Ausführungsform gemäß Fig. 7 sind die beiden Spiegel 4, 8 nicht parallel zueinander angeordnet. Der zunächst orthogonal zur Abtastfläche des Objekts verlaufende Beleuchtungsstrahlengang mit der optischen Achse 7 wird nach Durchlaufen der Linse und der aus den Spiegeln 4, 8 bestehenden Scanningeinheit derart abgelenkt, dass die optische Achse des nunmehr abgelenkten Beleuchtungsstrahlengangs nicht mehr orthogonal, sondern unter dem Winkel α , zur Flächennormale auf die Abtastfläche des Objekts auftrifft.

Der Ausführungsform gemäß Fig. 2 kann entnommen werden, dass im Beleuchtungsstrahlengang die optische Achse des Strahlengangs vor der aus dem Spiegel 4 bestehenden Scanningeinheit einen Winkel zur Drehachse 5 der Scanningeinheit aufweist, der von 0 Grad verschieden ist. Auch hierdurch ist es möglich, dass der abgelenkte Beleuchtungsstrahl nicht orthogonal auf die Abtastfläche des Objekts auftrifft. In dieser Ausführungsform entspricht der Einfallswinkel zwischen der optischen Achse des Beleuchtungsstrahls nach der Ablenkung durch den Scanspiegel 4 und der Abtastfläche des Objekts dem Brewster-Winkel. Hierdurch wird der Haupt-Rückreflex des Anregungslichts aus dem Anregungs- bzw. Detektionsstrahlengang minimiert.

Der Objekträger 6 wird von einer – in den Figuren nicht gezeigten – Transportvorrichtung entlang einer Richtung 11 bewegt. Durch den Scanvorgang der Scanningeinheit und der Bewegung des Objekträgers entlang einer Richtung wird das in Fig. 8 dargestellte Abtastmuster 10 erzeugt, das

sämtliche relevanten Bereiche des Objektträgers abtastet. Die Transportvorrichtung weist eine axiale Positionierungs- genauigkeit hinsichtlich der Fokusposition des Beleuchtungs- bzw. Detektionsstrahlengangs von 5 µm auf.

In der Ausführungsform aus Fig. 9 erfolgt die Beleuchtung der auf dem Objektträger befindlichen Objekte mit zwei Lichtstrahlen, nämlich mit dem Beleuchtungsstrahl 1 und 2. Als Lichtquelle für den Beleuchtungsstrahl 1 dient ein – in Fig. 9 nicht gezeigter – Argon-Krypton Laser, der Licht der Wellenlängen 488 nm und 568 nm emittiert. Die 5 Lichtquelle des Beleuchtungsstrahls 2 ist ein in Fig. 9 ebenfalls nicht gezeigter Helium-Neon Laser, der Licht der Wellenlänge 633 nm emittiert. Die Fluoreszenzemission, die durch Beleuchtungslicht der drei unterschiedlichen Wellenlängen angeregt wird, wird mit drei in Fig. 9 ebenfalls nicht 10 gezeigten Detektoren simultan detektiert.

Den Fig. 9 und 10 ist entnehmbar, dass zur Beleuchtung der zu scannenden Objekte nur ein Teil der Objektivapertur genutzt wird. Der kollinierte Beleuchtungsstrahl 1, der verglichen zum Querschnitt des Detektionsstrahlengangs 2 einen geringeren Querschnitt aufweist, wird über einen Einkoppelspiegel 12 eingekoppelt. In den Ausführungsformen gemäß den Fig. 9 und 10 wird zur Detektion mit dem Detektionsstrahlengang 2 nahezu die gesamte Apertur des Objektivs 3 ausgenutzt; der Beleuchtungsstrahlengang 1 weist eine 15 wesentlich kleinere Apertur auf.

In Fig. 10 ist dargestellt, dass der Hauptreflex des Anregungslichts 1 über einen Auskoppelspiegel 13 zu einem Fokuspositionsdetektor 14, 15 geleitet wird. Einkoppelspiegel 12 und Auskoppelspiegel 13 sind im Detektionsstrahlengang 2 positioniert und reduzieren daher die insgesamt verfügbare Detektionsapertur des Objektivs 3 nur geringfügig. In Fig. 11 ist die Querschnittsfläche des Detektionsstrahlengangs 2 sowie die Querschnittsfläche der Ein- bzw. Auskoppelspiegel 12, 13 dargestellt. Die gesamte Detektionsapertur 20 ist aufgrund der Anordnung der beiden Spiegel 12, 13 im Detektionsstrahlengang lediglich um etwa 8% reduziert, was sich kaum auswirkt.

Der Hauptreflex des Anregungslichts 1 trifft auf den Fokuspositionsdetektor 14, 15, der aus einer zweigeteilten 25 Photodiode besteht. Abhängig von der Fokusposition des Objektträgers 11 ist der eine oder der andere Teil des Fokuspositionsdetektors 14, 15 vermehrt mit Licht beaufschlagt. Die Daten des Fokuspositionsdetektors 14, 15 werden der Steuereinheit des Laserscanmikroskops zugeführt, die eine 30 Autofokussierung des Objektträgers durchführt. Die Autofokussierung wird über Stellelemente der Transportvorrichtung realisiert, die ihrerseits Positionsgeber aufweisen, die mit der Steuereinheit des Laserscanmikroskops verbunden sind, in der die Soll- mit der Ist-Position der Stellelemente 35 verglichen wird.

Der Beleuchtungsdurchmesser des Laserstrahls in der Objektebene weist einen Durchmesser von 50 µm auf. Hiermit können die Markierungsregionen, die einen Durchmesser von ca. 120 µm aufweisen, eindeutig identifiziert und lokalisiert und hinsichtlich ihrer Fluoreszenzemission mit einer hinreichenden Genauigkeit quantifiziert werden.

Abschließend sei ganz besonders darauf hingewiesen, dass die voranstehend erörterten Ausführungsbeispiele lediglich zur Beschreibung der beanspruchten Lehre dienen, 40 diese jedoch nicht auf die Ausführungsbeispiele einschränken.

Patentansprüche

1. Anordnung zur optischen Abtastung eines Objekts, insbesondere in der vorzugsweise konfokalen Laserscan-Mikroskopie, wobei im Beleuchtungs/Detektions-

strahlengang (1, 2) eine Linse oder ein Objektiv (3) und mindestens ein Scanspiegel (4) angeordnet sind, dadurch gekennzeichnet, dass der Spiegel (4) mit einer zur Abtastfläche des Objekts zumindest weitgehend orthogonalen Drehachse (5) dreht bzw. schwenkt.

2. Anordnung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Drehachse (5) des Spiegels (4) zumindest weitgehend mit der optischen Achse der Linse oder des Objektivs (3) zusammenfällt.

3. Anordnung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Drehachse (5) des Spiegels (4) zumindest weitgehend parallel zu der optischen Achse der Linse oder des Objektivs (3) ist.

4. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass im Beleuchtungsstrahlengang der Linse oder dem Objektiv (3) der Spiegel (4) nachgeordnet ist.

5. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass im Beleuchtungsstrahlengang der Linse oder dem Objektiv (3) mindestens zwei Spiegel (4, 8) nachgeordnet sind.

6. Anordnung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die beiden Spiegel (4, 8) von einer gemeinsamen Halterung (9) gehalten sind.

7. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass im Beleuchtungsstrahlengang den beiden Spiegeln (4, 8) die Linse oder das Objektiv (3) nachgeordnet ist.

8. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Linse oder das Objektiv (3) zwischen den beiden Spiegeln (4, 8) angeordnet ist.

9. Anordnung nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass die beiden Spiegel (4, 8) und die Linse oder das Objektiv (3) von einer gemeinsamen Halterung (9) gehalten sind.

10. Anordnung nach Anspruch 6 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Halterung (9) mit einer zur Abtastfläche des Objekts zumindest weitgehend orthogonalen Drehachse (5) dreht bzw. schwenkt.

11. Anordnung nach Anspruch 6 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Drehachse der Halterung (9) zumindest weitgehend parallel zur optischen Achse (7) des Abbildungsstrahlengangs vor der Halterung (9) angeordnet ist.

12. Anordnung nach einem der Ansprüche 6 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Halterung (9) aus Material geringer Masse/Dichte angefertigt ist.

13. Anordnung nach einem der Ansprüche 5 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die beiden Spiegel (4, 8) parallel zueinander angeordnet sind.

14. Anordnung nach einem der Ansprüche 5 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die beiden Spiegel (4, 8) nicht parallel zueinander angeordnet sind.

15. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die optische Achse des Beleuchtungsstrahlengangs vor der Scanningeinheit einen Winkel zur Drehachse (5) der Scanningeinheit aufweist, der von 0 Grad verschieden ist.

16. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass vorzugsweise durch entsprechende Anordnung mindestens eines Spiegels der Einfallswinkel zwischen der optischen Achse des Strahlengangs und der Abtastfläche des Objekts von 0 Grad verschieden ist.

17. Anordnung nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass der Winkel größer als 0 und kleiner als 20 Grad ist.

DE 199 50 225 A 1

9

10

18. Anordnung nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass der Winkel dem Brewster-Winkel entspricht.
19. Anordnung nach einem Ansprache 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass eine Transportvorrichtung den/die Objekträger (6) entlang einer Richtung (11) bewegt.
20. Anordnung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Transportvorrichtung eine axiale Positionierungsgenauigkeit des Objekträgers (6) von 10 10 μm aufweist.
21. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass ein bzw. mehrere Lichtstrahlen zur Beleuchtung dienen.
22. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 21, 15 dadurch gekennzeichnet, dass ein bzw. mehrere Lichtstrahlen zur Detektion dienen.
- 23.. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass als Lichtquelle mehrere Laser gleichzeitig dienen. 20
24. Anordnung nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass der/die Laser auch jeweils verschiedene Wellenlängen emittieren.
25. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass als zur Detektion mehrere Detektoren gleichzeitig verwendet werden. 25
26. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass zur Beleuchtung der zu scannenden Objekte nur ein Teil der Objektivapertur genutzt wird. 30
27. Anordnung nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass zur Beleuchtung der zu scannenden Objekte das Anregungslight über einen Spiegel (12) eingekoppelt wird.
28. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 27, 35 dadurch gekennzeichnet, dass der Hauptreflex des Anregungslights über einen Spiegel (13) zu einem Fokuspositionsdetektor (14, 15) geleitet wird.
29. Anordnung nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass der Fokuspositionsdetektor aus einer 40 zwei- oder viergeteilten Photodiode besteht.
30. Anordnung nach Anspruch 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, dass mit Hilfe der Daten des Fokuspositionsdetektors eine Auto-Fokussierung des Objekträgers durchführbar ist. 45
31. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 30, dadurch gekennzeichnet, dass der Beleuchtungsdurchmesser des Laserstrahls bzw. der Laserstrahlen in der Objektebene einen Durchmesser aufweist, der größer als 1 μm und kleiner als 300 μm ist. 50

Hierzu 11 Seite(n) Zeichnungen

55

60

65

- Leerseite -

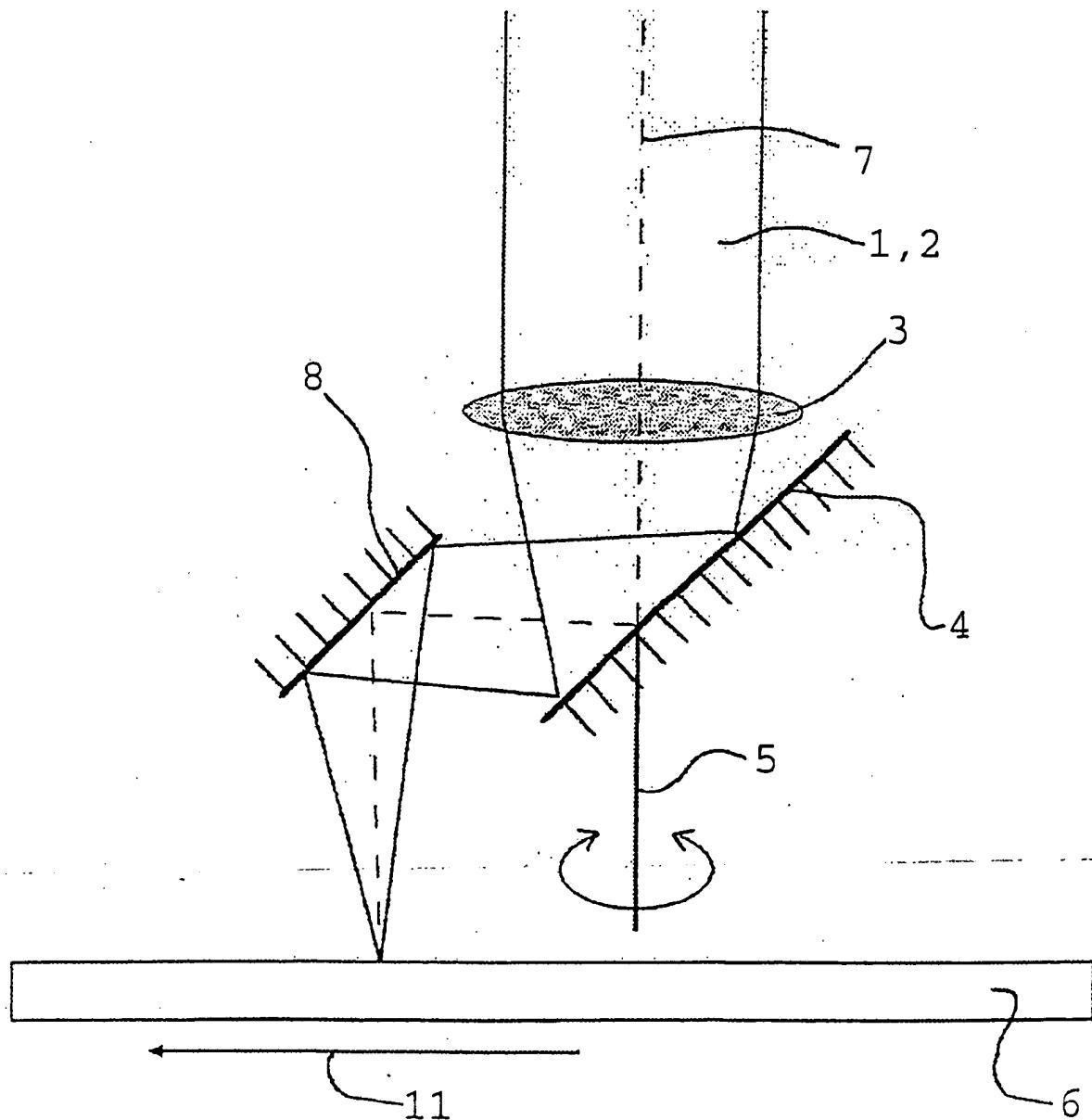


Fig. 1

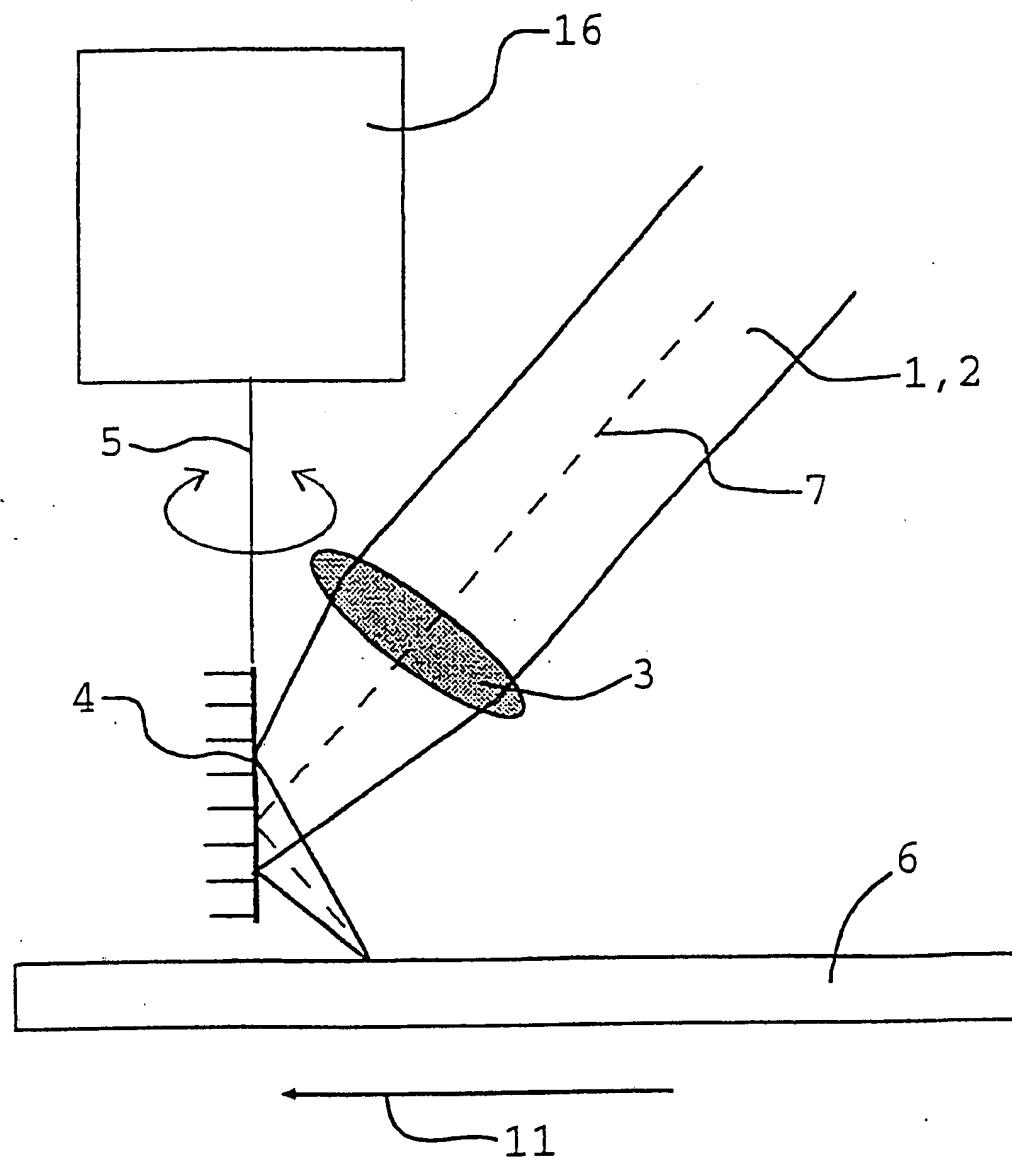


Fig. 2

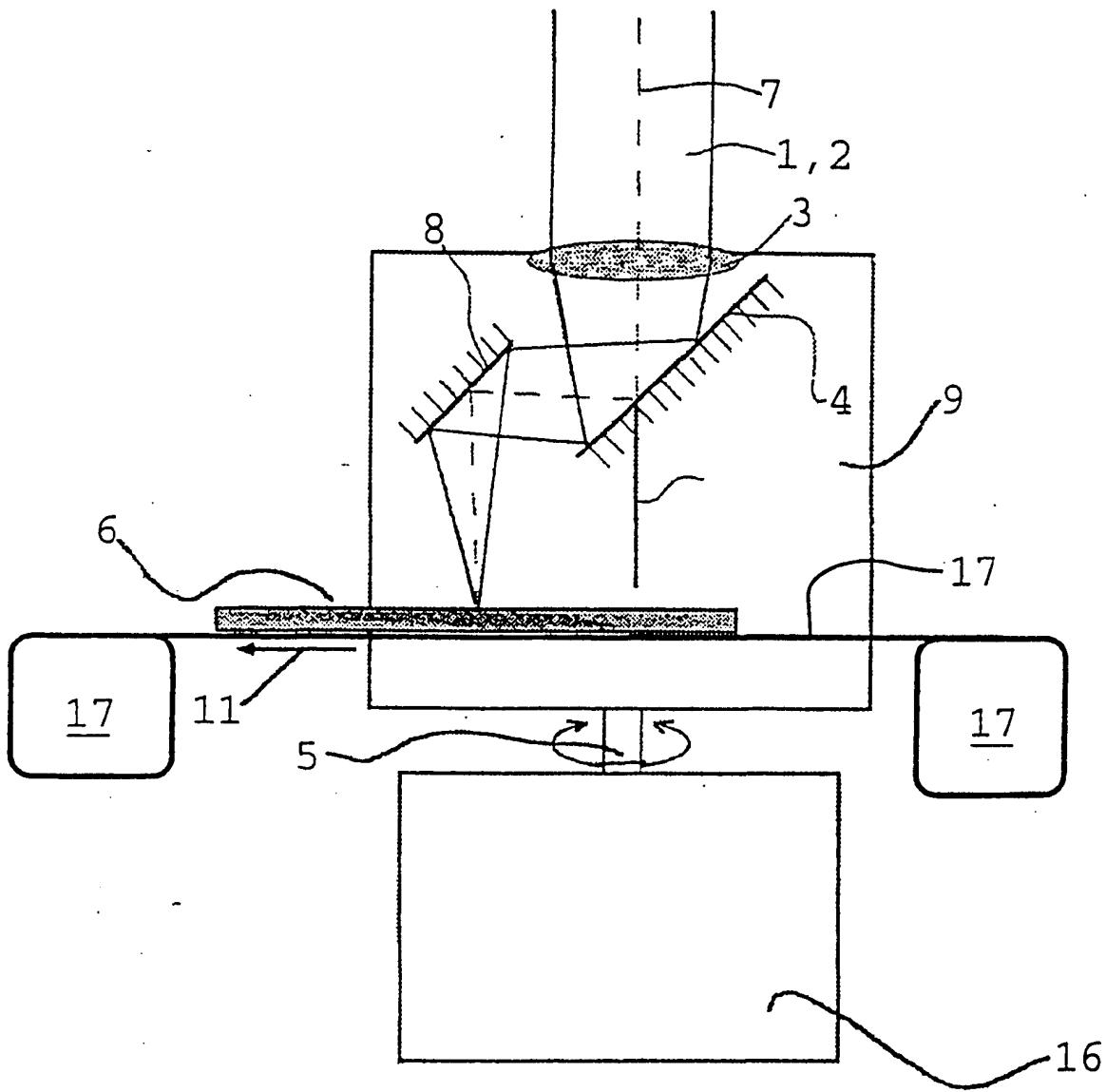


Fig. 3

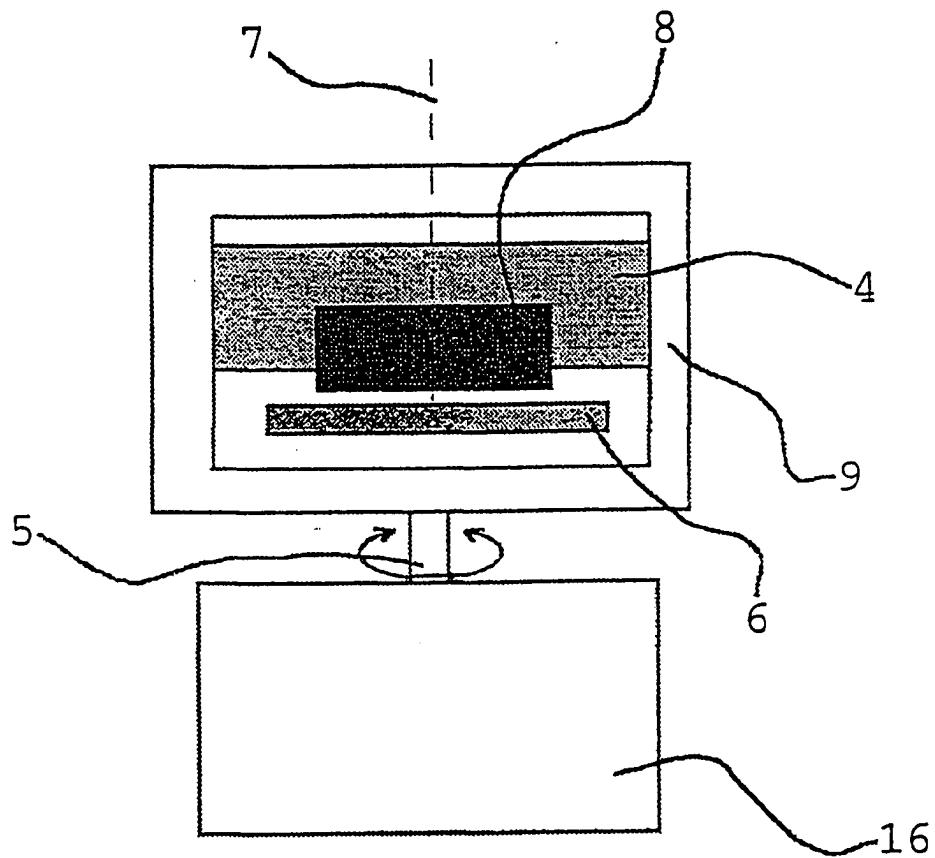


Fig. 4

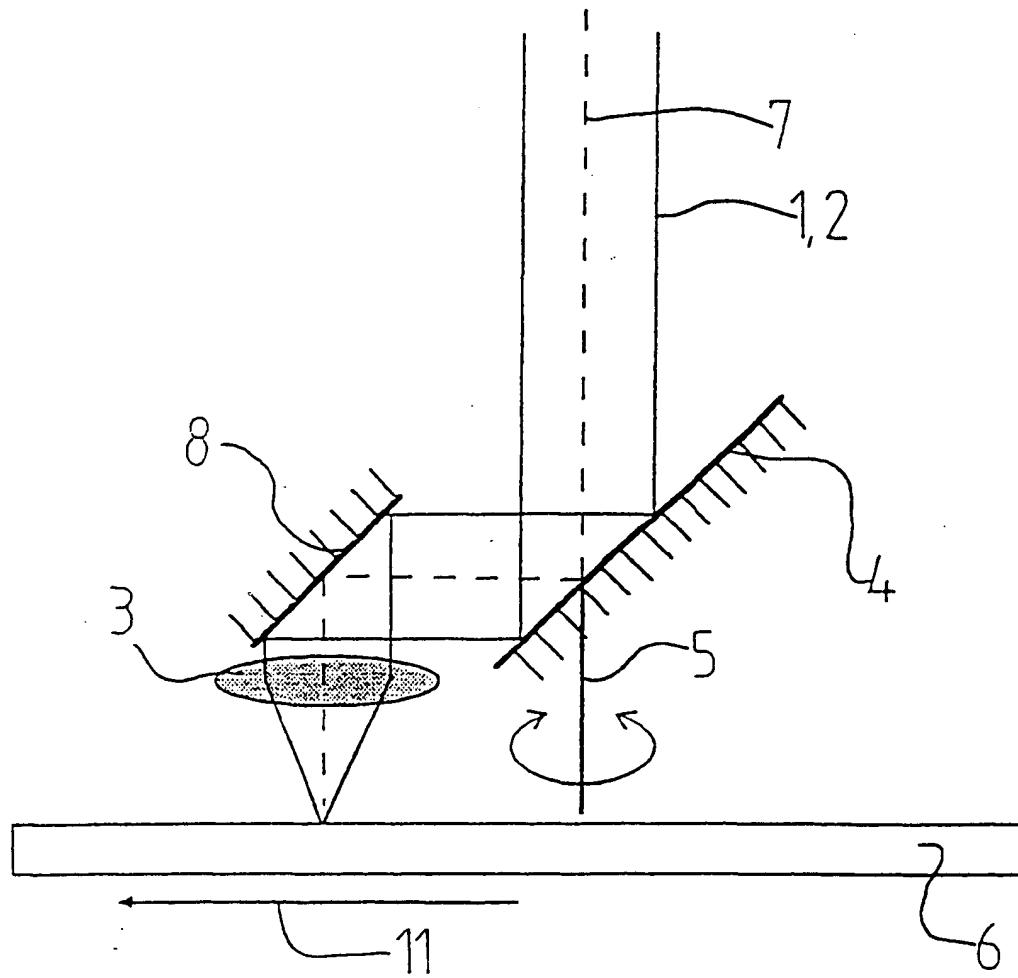


Fig. 5

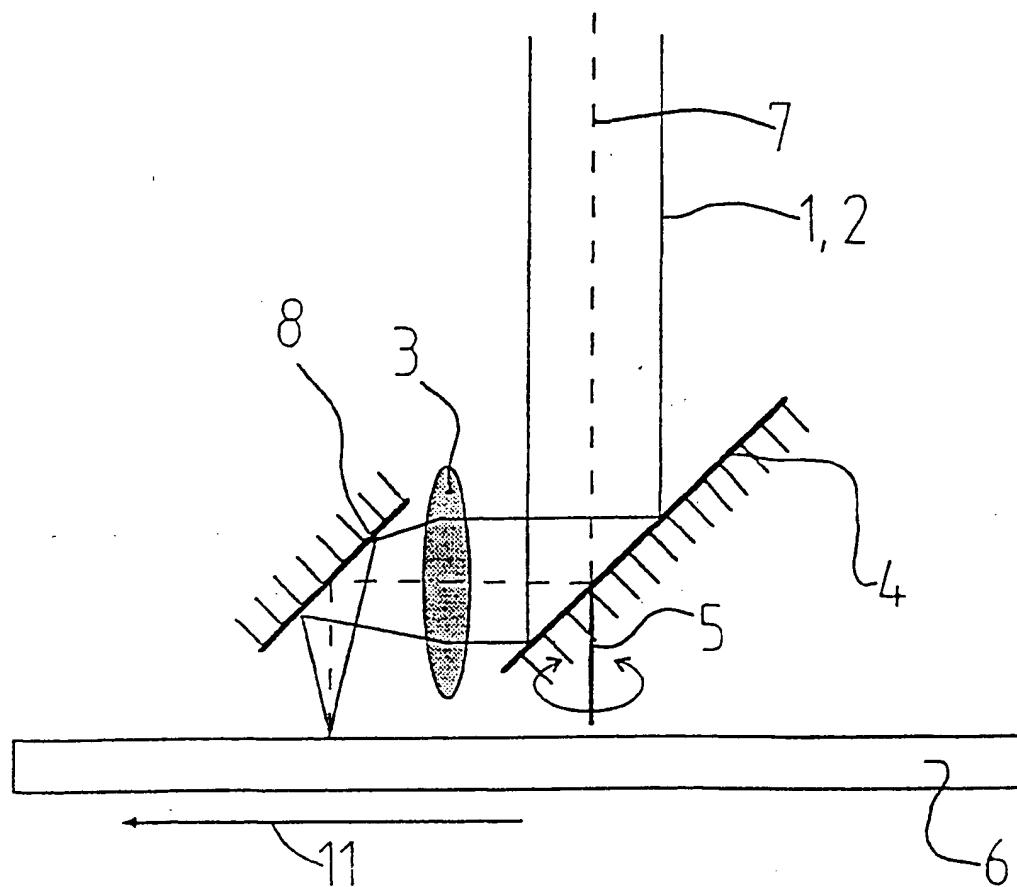


Fig. 6

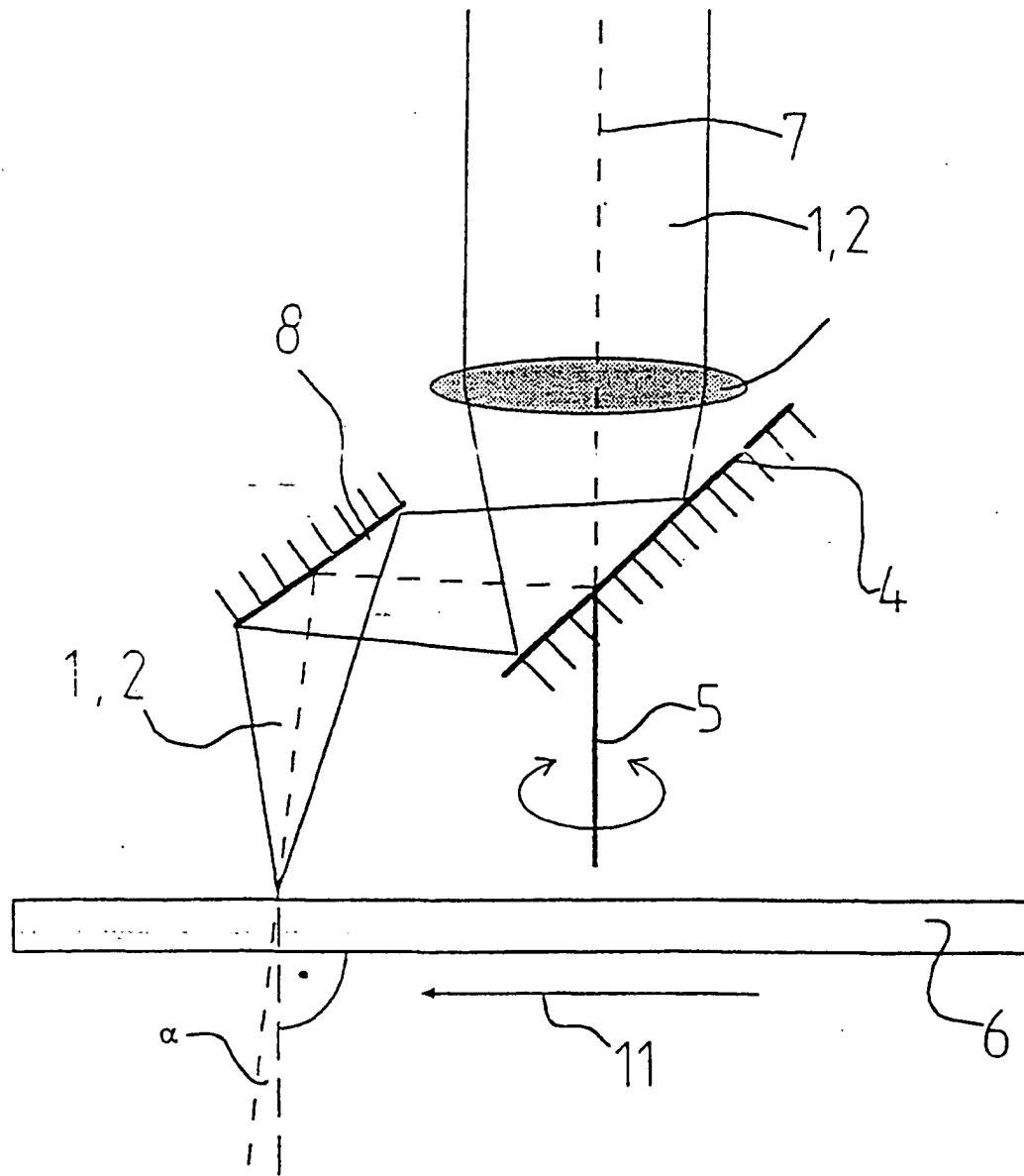


Fig. 7

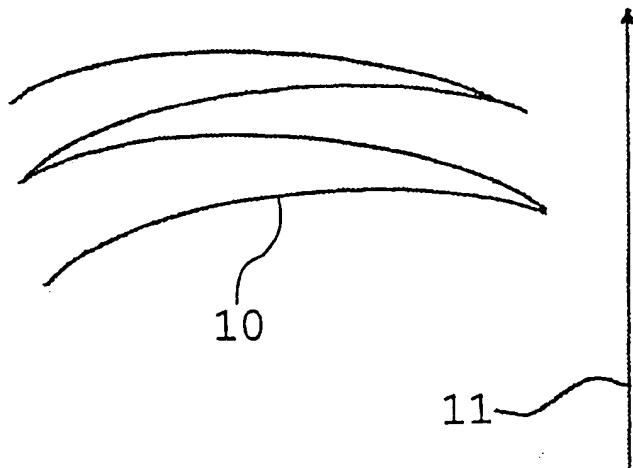


Fig. 8

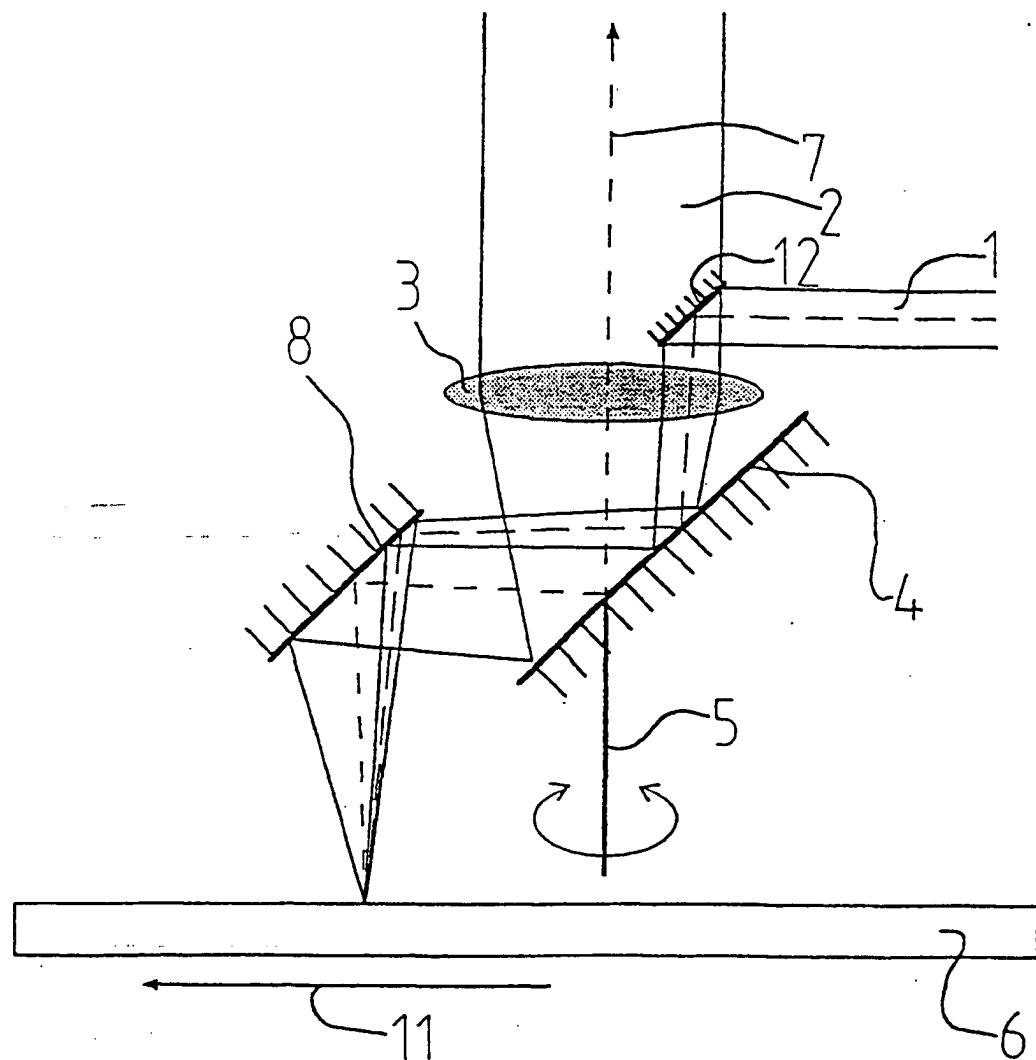


Fig. 9

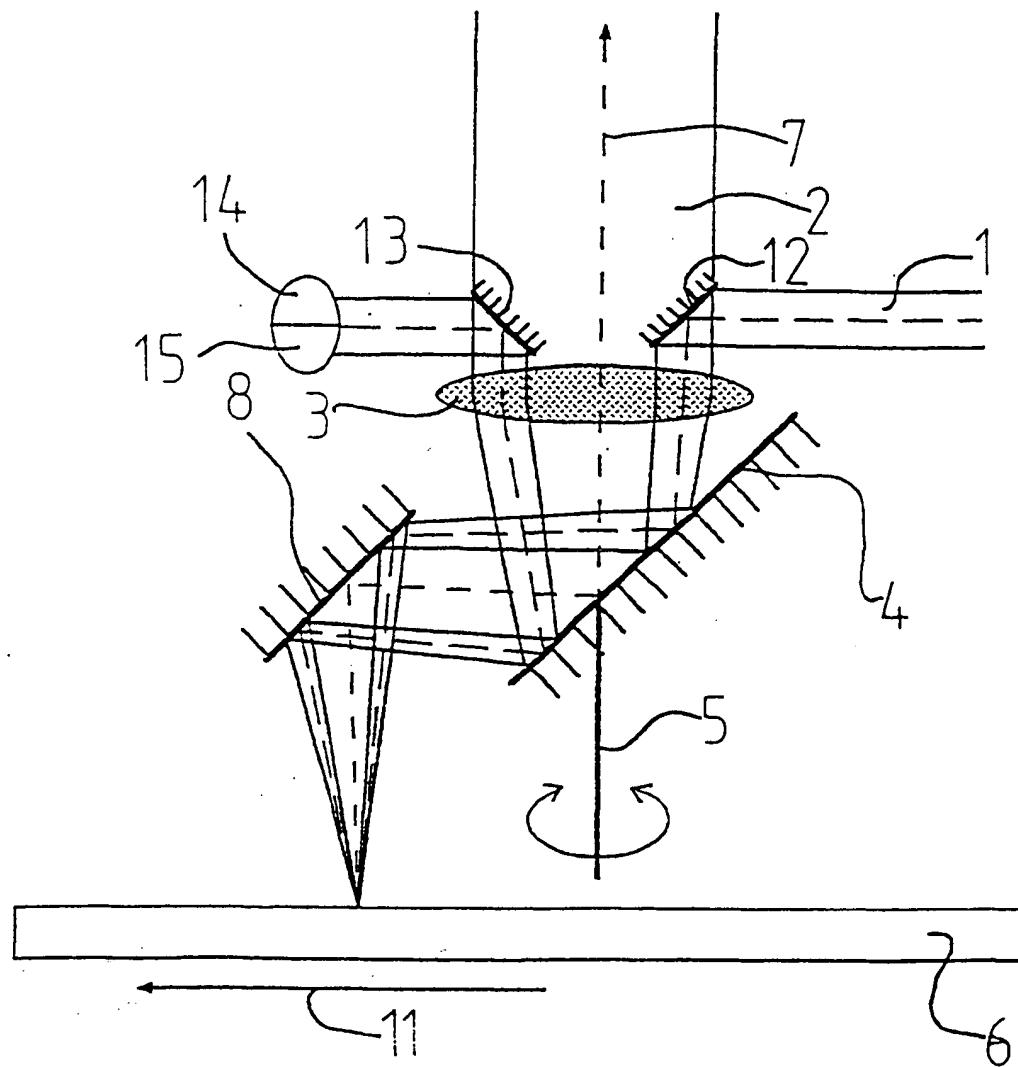


Fig. 10

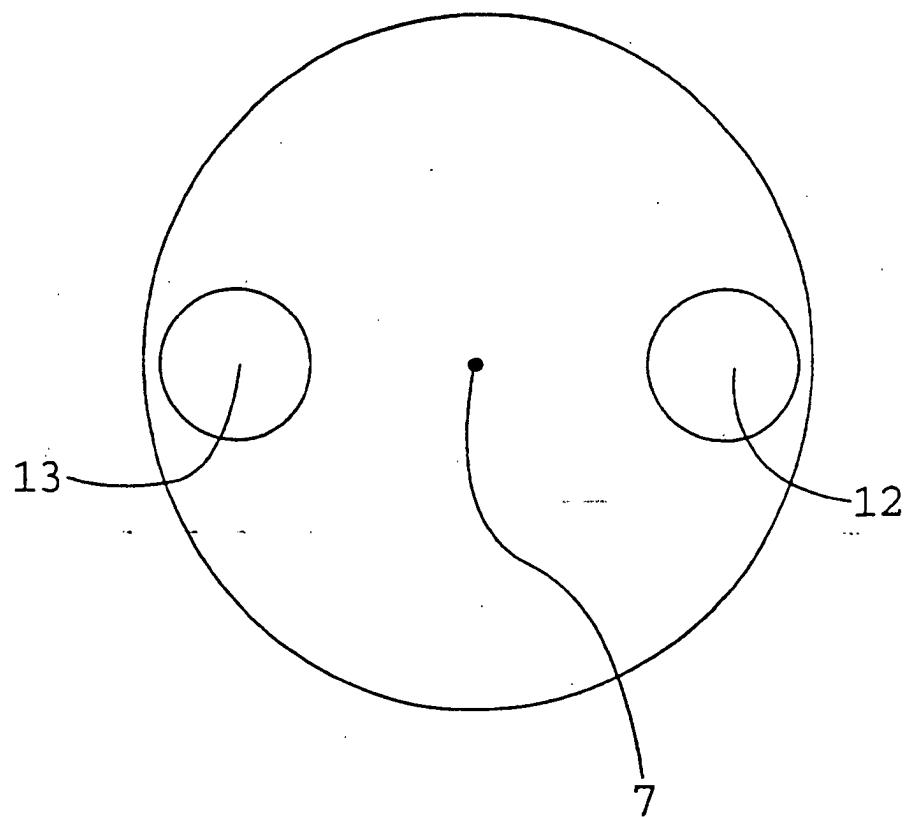


Fig. 11